



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

DEBORAH DA COSTA LAMAR

ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PRODUTORAS DE
AGENTES ANTIMICROBIANOS

Brasília

2012

DEBORAH DA COSTA LAMAR

ISOLAMENTO DE ESTIRPES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* PRODUTORAS DE
AGENTES ANTIMICROBIANOS

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Queiroz da Silva

Brasília

2012

Isolamento de estirpes de *Bacillus thuringiensis* produtoras de agentes antimicrobianos

DEBORAH DA COSTA LAMAR*; PAULO ROBERTO QUEIROZ DA SILVA**

Resumo

Bacillus são organismos Gram positivos, formam esporos tolerantes ao calor e a dessecação, possuem grande adaptabilidade quanto às condições fisiológicas (temperatura, pH e salinidade). A maioria das espécies é capaz de produzir várias substâncias que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outros microrganismos. Tem-se relatado, desde os anos 50, que várias bactérias do gênero *Bacillus* tem a capacidade de produzir substâncias com a atividade antimicrobiana, tais como, peptídeos ou bacteriocinas. O objetivo da pesquisa foi identificar estirpes de *B. thuringiensis* presentes em solos de cerrado produtoras de substâncias com efeito inibitório contra outros microrganismos. Foram coletadas 16 amostras de solo e realizados os procedimentos de isolamento com princípio de diluição de 10 e 100 vezes das amostras utilizando 1 g de solo, aplicação de choque térmico e inoculação em placas de Petri contendo meio ágar LB. As placas foram colocadas na estufa por 48 h a 28 °C. Do total de amostras coletadas, 6 apresentaram crescimento e, a partir destas, foram feitos ensaios de inibição para testar a capacidade de produção de bacteriocinas. O ensaio foi realizado através da adaptação do método de difusão em poços. Após a incubação a 28 °C por 24 h as placas foram observadas quanto a formação de halos, indicando a inibição. Nesse caso, somente duas estirpes apresentaram essa propriedade, sendo então submetidas a novos ensaios de inibição (ensaio com caldo; teste de estabilidade térmica; teste com solvente orgânico) para avaliar a atividade delas. Dessa forma, as estirpes de *B. thuringiensis* possuem a capacidade de produzir toxinas inibindo o crescimento de outras estirpes de *B. thuringiensis*, até mesmo quando utilizado o caldo, pois estas secretam as toxinas no meio extracelular, sendo inibidas quando aquecidas a 80 °C e ativadas quando dissolvidas em solvente orgânico.

Palavras-chave: Bacteriocinas, Peptídios, Toxinas.

*Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

** Doutor em Biologia Animal - UnB, Professor de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1 INTRODUÇÃO

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram positiva esporulante. Os esporos apresentam-se sob a forma de corpúsculos esféricos ou ovóides, livres ou no interior da bactéria (TEYSSOU *et al.*, 1998). Estes esporos (Figura 1) produzem inclusões cristalinas responsáveis pela atividade tóxica da espécie e pela sua identificação (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; LUTH; WOLFERSBERGER, 2000). Este bacilo pertence à família Bacillaceae, varia entre 0,5 a 2,5 µm de largura e 1,2 a 10 µm de comprimento (MIRALLES; PERES, 2004). Além disso, cresce em temperaturas que variam entre 25 °C e 37 °C.



Figura 1. Microscopia de contraste de fase de *B. thuringiensis*. Dentro das células estão presentes o esporo (branco) e o cristal (preto).

Segundo Jack *et al.*, (1995), as bactérias são capazes de produzir várias substâncias que podem ser inibitórias tanto para si quanto para outros microrganismos, sendo assim várias espécies de bactérias do gênero *Bacillus* produzem substâncias com atividade antimicrobiana.

Bactérias ácido lácticas (LAB) têm sido usadas há muito tempo em fermentação para preservar a qualidade nutritiva dos alimentos. O principal efeito antimicrobiano é exercido pela LAB é a produção de ácido lático e de redução de pH. Além disso, LAB produz vários compostos antimicrobianos, tais como, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e bacteriocinas (AMMOR *et al.*, 2006).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos ativos contra outras bactérias (BOWDISH *et al.*, 2005; COTTER *et al.*, 2005.), devido a sua alta toxicidade em relação à bactéria patogênica (CLEVELAND *et al.*, 2001). Podem ser produzidas por bactérias Gram negativas e Gram positivas (SAVADOGO *et al.*, 2006), tendo grande interesse devido ao seu uso potencial como conservantes de alimentos para inibir bactérias Gram positivas, tais como, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, importantes patógenos de veiculação alimentar (CLEVELAND *et al.*, 2001). *B. thuringiensis* pode ser utilizado como uma fonte de bacteriocinas ativas contra espécies de *B. cereus*.

Nos últimos anos, a produção de bacteriocina por LAB tem atraído a atenção significativa por potencial utilização como aditivos seguros para a conservação de alimentos (DIOP *et al.*, 2007). A nisina, conhecida desde os anos 20, foi a primeira bacteriocina que se mostrou promissora para o uso na preservação de alimentos. O uso dessa bacteriocina em escala comercial ocorre há quase 5 anos pela indústria alimentícia (BIZANI, 2004), tendo eficácia em vários microrganismos deteriorantes e patogênicos como a *Listeria monocytogenes* e sua aplicação em produtos alimentares (SCHILLINGER *et al.*, 2001; FREITAS *et al.*, 2008; STASZEWSKI; JAGUS, 2008).

Quatro classes foram criadas para classificar tais bacteriocinas, sendo a classe I representada por pequenos peptídeos termoestáveis, de baixa massa molecular (< 5 kDa), Nisina; Classe II, pequenos peptídeos termoestáveis (< 10 kDa), com estrutura helicoidal e alta especificidade contra *Listeria monocytogenes*; Classe III, peptídeos termolábeis de alta massa molecular (> 30 kDa), às quais promovem lise da celular da célula alvo e a Classe IV, com grandes complexos de peptídeos compostos de carboidratos e lipídeos em sua estrutura (CLEVELAND *et al.*, 2001).

Há muitas espécies do gênero *Bacillus* que possui uma variedade de espécies industrialmente importantes, sendo usadas na conservação de alimentos. Antibióticos, enzimas e inseticidas são produtos vindos da fermentação desses *Bacillus*, sendo hoje utilizados em formulações comerciais (ARONSON *et al.*, 1986).

Bacillus thuringiensis tem sido usado como um bioinseticida seguro por durante mais de 50 anos (FAVRET; YOUSTERN, 1989). Estes organismos são produtores de determinadas bacteriocinas, como Tohicina (PAIK *et al.*, 1997), Thuricina 7 (CHERIF *et al.*, 2001), Thuricina 439 (AHERN *et al.*, 2003) e Entomocina 9 (CHERIF *et al.*, 2003).

Sendo assim, surge a necessidade de se desenvolver alternativas de conservação para que, aliadas às tecnologias existentes, seja possível disponibilizar para a população alimentos

de qualidade cada vez melhor e mais seguros sob o ponto de vista microbiológico e toxicológico (JAY, 2000).

O objetivo deste trabalho foi identificar estirpes de *B. thuringiensis*, presentes em solos de cerrado, produtoras de substâncias com efeito inibitório contra outros microrganismos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Material e Métodos

2.1.1 Isolamento

As estirpes foram coletadas a partir de solo do cerrado, com autorização do Ibama pelo cadastro no SISBIO (Número da autorização: 30683-1) (Tabela 1). Em 9 mL de solução salina 0,9% foram adicionados 1 g de solo das respectivas amostras e essas foram diluídas 1000 vezes.

Aproximadamente 1000 µL do diluído de 1000 vezes foram submetidas a choque térmico, aquecidas a 80 °C durante 12 minutos e logo em seguida transferidas para uma bacia com gelo por 5 minutos e plaqueadas em ágar LB (extrato de levedura 5 g, ágar bacteriológico 5 g, peptona bacteriológica 10 g, cloreto de sódio 10 g, penicilina 0,5 mL e água q.s.p 1000 mL, pH 7,2). Em seguida, 100 µL do material foram semeados em placa de meio LB ágar e as placas foram incubadas por 48 h a 28 °C. As colônias crescidas foram coletadas e plaqueadas em meio LB para confirmação do isolamento.

2.1.2 Detecção da atividade de bacteriocina.

Foram realizadas duas estratégias: Primeiro as estirpes de *B. thuringiensis* foram crescidas em meio LB líquido por 48 h a 28 °C e agitação de 80 rpm. Após esse período de incubação, as estirpes foram utilizadas nos experimentos de competição entre as estirpes. Segundo, as estirpes foram crescidas em meio LB líquido por 48 h a 28 °C e agitação de 80 rpm. Após esse período, realizou-se a centrifugação a 7500 rpm durante 10 min, retirada do sobrenadante (caldo) e filtração do caldo em membranas Millex-GV de 0,22 µm (Millipore S.A., St Quentin-em-Yvelines). O filtrado foi mantido a -20 °C até o momento do uso.

Tabela 1. Locais de coleta das amostras de solo para isolamento de *B. thuringiensis*.

Local	Data	Latitude	Longitude
Asa Sul	26/08/2011	15°47,8063'S	47°55,1962'O
Lago Norte I	26/08/2011	15°44,0643'S	47°53,0796'O
Parque da Cidade I	26/08/2011	15°47,8063'S	47°53,9749'O
Pier 21	26/08/2011	15°49,1833'S	47°52,4640'O
Parque da Cidade II	20/09/2011	15°47,7149'S	47°53,5782'O
Parque Olhos D'água I	20/09/2011	15°44,2992'S	47°53,6040'O
Lago Norte II	23/09/2011	15°44,0647'S	47°53,0813'O
Parque Olhos D'água II	13/10/2011	15°44,5592'S	47°53,1502'O
Vicente Pires	12/03/2012	15°79,4339'S	48°04,9076'O
Lago Norte II	13/03/2012	15°44,5316'S	47°53,5784'O
Asa Norte- Uniceub	14/03/2012	15°45,9713'S	47°53,6529'O

2.1.3 Ensaio de inibição

A ação da bacteriocina foi verificada a partir da adaptação do método de difusão em poços estabelecido por Jack et al. (1995).

2.1.4 Ensaio com as estirpes

Foi depositada uma camada basal de 15 mL de meio LB ágar em placas de Petri. Após o resfriamento dessa camada, foram posicionadas três ponteiros de 1000 µL para formação dos poços (Figura 2).

Uma vez fixadas as ponteiros, 25 mL de ágar LB e 1 mL do caldo de uma estirpe foram misturadas em tubo cônico de 50 mL e depositadas sobre a camada basal. Após a solidificação do meio, as ponteiros foram retiradas e os poços foram preenchidos com 50 µL de outra estirpe. Após 48 horas de incubação a 28 °C, verificou-se o aparecimento de uma zona de inibição. Os halos foram medidos e uma média foi calculada, para se avaliar a intensidade de inibição.

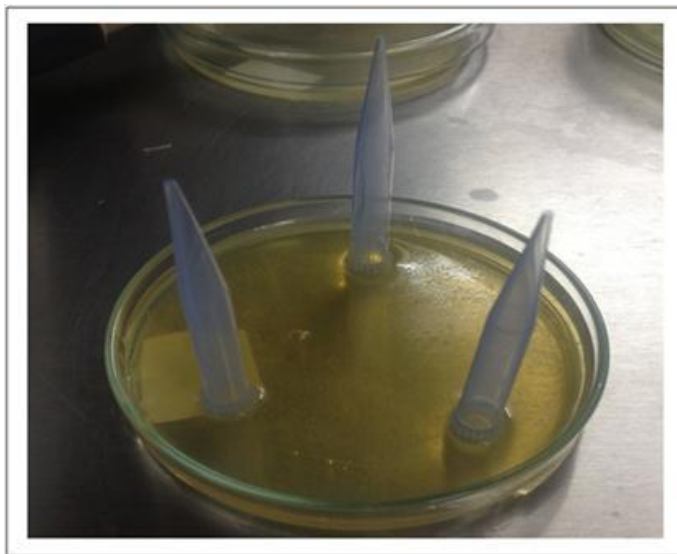


Figura 2. Preparo da camada basal para a formação dos poços para a realização da metodologia da difusão em poços.

2.1.5 Ensaio com filtrado

Após a produção da camada basal e adição do meio LB contendo uma estirpe de Bt (conforme descrito anteriormente), adicionou-se 50 μ L do meio no qual houve o crescimento de Bt (descrito anteriormente) filtrado através de membrana Millex-GV de 0,22 μ m (Millipore S.A., St Quentin-em-Yvelines). Após 48 horas de incubação a 28 °C, verificou-se o aparecimento de uma zona de inibição. Os halos foram medidos e uma média foi calculada para se avaliar a intensidade de inibição.

2.1.6 Teste de estabilidade térmica

Analizou-se a estabilidade térmica das bacteriocinas incubando-se o meio filtrado após crescimento de *B. thuringiensis* a 80 °C por 15 min seguindo-se resfriamento a 4 °C por 5 min. Em seguida, realizou-se o teste de inibição conforme descrito anteriormente.

2.1.7 Teste com solvente orgânico

Analizou-se a estabilidade da bacteriocina em solvente polar adicionando-se 1 volume do filtrado em 1 volume de álcool isopropílico. Em seguida, procedeu-se ao teste de inibição conforme descrito anteriormente.

3 Resultados

Na fase de isolamento de *B. thuringiensis* foram coletadas 11 amostras de solo no Distrito Federal em várias localidades. Do total de amostras, 6 apresentaram crescimento, às quais foram denominadas como estirpes A, B, C, D, X e Z.

Somente duas estirpes (B e C) apresentaram resultados de inibição positivo quando colocadas com as outras em uma mesma placa e avaliadas pelo método de difusão em poços. Os halos formados podem ser observados na figura 3. Sugere-se que algumas estirpes de *B. thuringiensis* isoladas produziram bacteriocinas devido ao fato de inibirem o crescimento das demais estirpes.

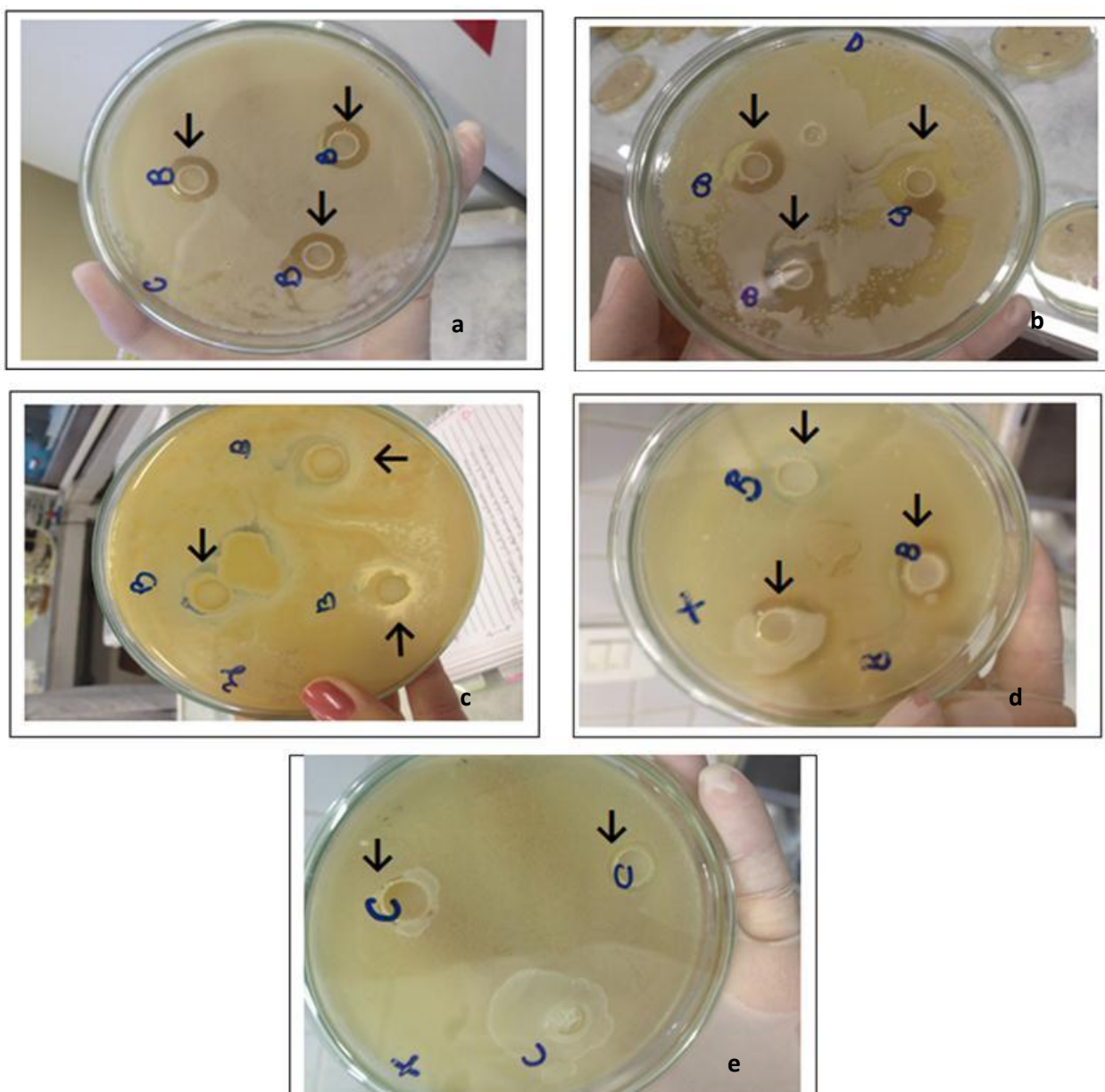


Figura 3a: Halo de inibição, estirpe B (dentro) inibindo a estirpe C (fora); 3b: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a D (fora); 3c: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a Z (fora); 3d: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a X (fora); 3e: Halo de inibição, C (dentro) inibindo a X (fora).

O primeiro teste para avaliação da atividade das bacteriocinas, também feito por difusão em poços foi utilizando o filtrado do meio no qual a bactéria cresceu. A estirpe B apresentou o mesmo padrão, inibindo as mesmas bactérias (Figura 4) e a estirpe C o mesmo resultado conforme anteriormente descrito. A formação de halo mostra que tais bactérias são capazes de secretar seus produtos antimicrobianos no meio nos quais crescem, sendo assim, seus filtrados também conseguiram inibir o crescimento de outras estirpes.

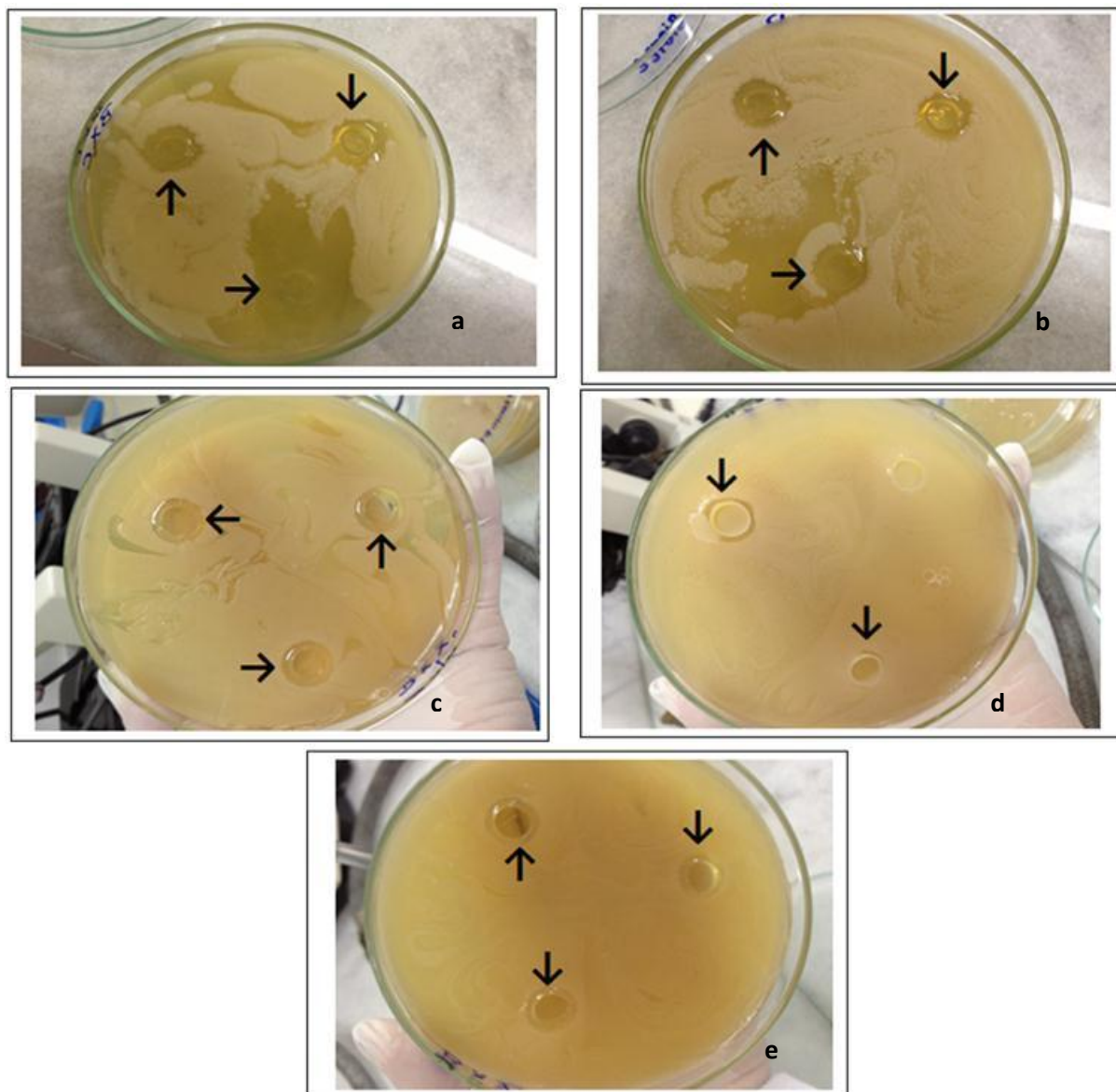


Figura 4a: Halo de inibição, estirpe B (dentro) inibindo a estirpe C (fora); 4b: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a D (fora); 4c: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a Z (fora); 4d: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a X (fora); 4e: Halo de inibição, C (dentro) inibindo a X (fora).

Quando aquecidas a uma temperatura de 80 °C, as bacteriocinas obtidas das estirpes B e C foram inativadas não conseguindo inibir nenhuma outra estirpe, sendo sensíveis a temperaturas elevadas. Esse dado sugere a natureza protéica das bacteriocinas.

Na figura 5 são mostrados os halos formados no terceiro teste de avaliação da atividade, nos quais as estirpes B e C foram dissolvidas em isopropanol. Esse último teste indica que mesmo na presença de um solvente diferente da água as bacteriocinas ainda são capazes de manter sua atividade antimicrobiana, o isopropanol não é capaz de degradar as bacteriocinas, diferentemente de quando são aquecidas. No controle feito somente com o solvente não teve nenhum resultado de inibição, confirmando então que a inibição veio das bactérias e não do solvente.

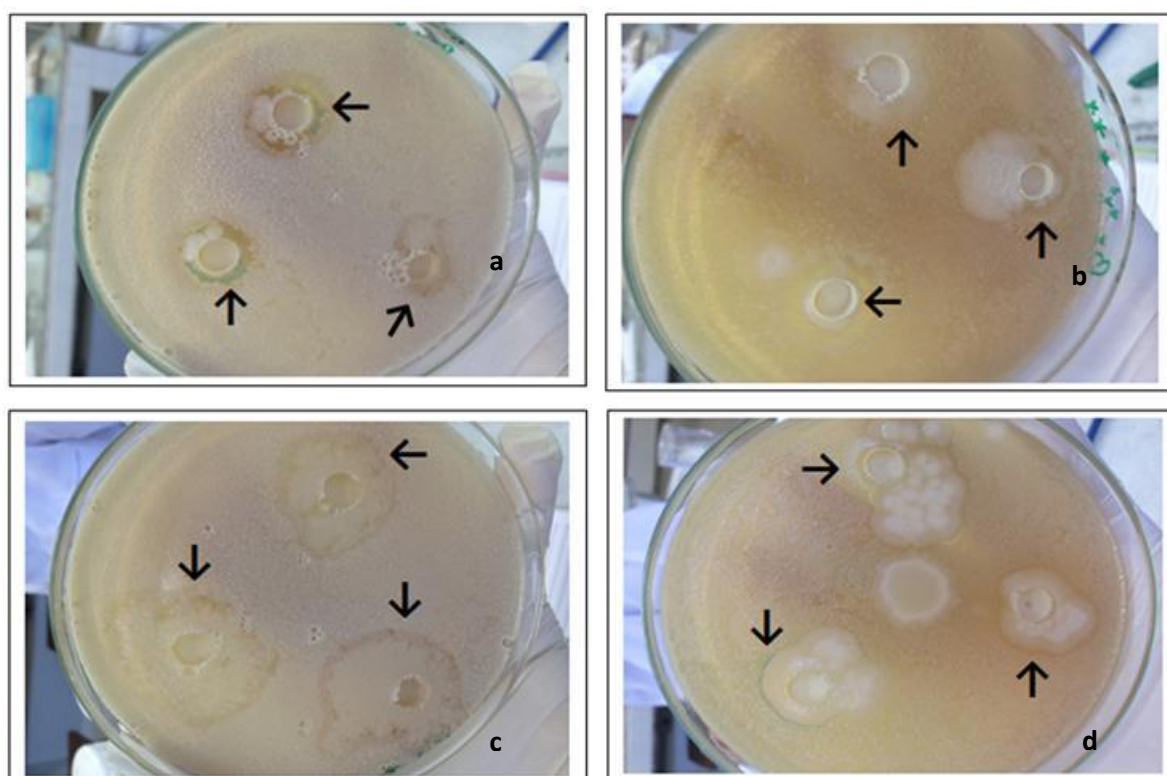


Figura 5a: Halo de inibição, estirpe B (dentro) inibindo a estirpe D (fora); 5b: Halo de inibição, Z (dentro) inibindo a D (fora); 5c: Halo de inibição, B (dentro) inibindo a X (fora); 5d: Halo de inibição, C (dentro) inibindo a X (fora).

Como visto nas figuras, as estirpes B e C foram as únicas dentre as demais estirpes que apresentaram resultados para produção de bacteriocina. Para cada teste realizado seus halos de inibição foram medidos e uma média foi calculada a fim de se determinar a intensidade de inibição de cada bacteriocina para determinada estirpe.

No teste estirpe versus estirpe de *B. thuringiensis* (Tabela 2) observou-se que a estirpe B, além de inibir mais estirpes apresenta seus halos em maior tamanho que a estirpe C, sendo sua inibição mais intensa e, também, entre as bactérias que inibiu mostra ser mais intensa quando se trata da inibição da estirpe D (0,36 cm), na qual o halo apresentou maior tamanho.

Tabela 2. Média de inibição a partir da medida dos halos na inibição do teste *B. thuringiensis* versus estirpe de *B. thuringiensis*.

Dentro/fora	A	B	C	D	X	Z
A		-	-	-	-	-
B	-		0,3 cm	0,36 cm	0,23 cm	0,27 cm
C	-	-		-	0,10 cm	-
D	-	-	-		-	-

- significa ausência de halo de inibição.

Quando se trata da inibição com o filtrado (Tabela 3), observa-se que a mesma estirpe B continua inibindo as mesmas bactérias, sendo que os diâmetros dos halos diminuem, sendo o halo feito com a estirpe D o maior de todos os outros.

Tabela 3. Média de inibição a partir da medida dos halos na inibição do teste estirpe versus caldo filtrado de *B. thuringiensis*.

Dentro/Fora	A	B	C	D	X	Z
B	-		1,5 cm	1,96 cm	1,4 cm	1,6 cm
C	-	-	-	-	-	-

- significa ausência de halo de inibição.

O teste com solvente orgânico (Tabela 4) mostra quais estirpes as bactérias B e C inibiram. Observa-se que somente neste, B não inibiu C, logo o isopropanol teve efeito significativo para a inibição de C.

Tabela 4. Média de inibição a partir da medida dos halos na inibição do teste estirpe versus caldo filtrado de *B. thuringiensis* adicionado de isopropanol.

Dentro/Fora	A	B	C	D	X	Z
B	-	-	-	0,9 cm	0,5 cm	0,2 cm
C	-	-	-	-	0,1 cm	-

- significa ausência de halo de inibição.

Os testes realizados mostraram-se positivos para formação de halos. Tal resultado sugere a existência de bacteriocinas produzidas pelos *Bacillus* isolados, pois as estirpes testadas apresentaram caráter inibitório.

É observado que a estirpe B possui uma atividade maior em relação a C, visto que esta foi capaz de inibir quase todas as estirpes nos três testes de inibição, ensaio com as estirpes, ensaio com o caldo e teste com solvente orgânico. No teste de estabilidade térmica, no qual o caldo foi aquecido a 80 °C, a estirpe B foi inativada, não conseguindo inibir nenhuma das outras estirpes como nos outros testes.

Já a estirpe denominada C apresentou características diferentes, inibindo somente a estirpe X, tendo esse resultado no ensaio com as estirpes e no teste com solvente orgânico, nos demais testes ela foi inativada. O fato de inibir somente essa estirpe e de não inibir com o filtrado, mostra que ela outro fator de inibição quando comparado com a estirpe B, que mostra que além de produzir sua toxina é capaz de secretá-la no meio no qual cresceu.

Em relação ao tamanho dos halos formados, a estirpe B apresenta também uma ação maior, pois seus halos apresentam-se sempre em maior tamanho, principalmente quando colocado em contato com a estirpe D. Já os halos formados entre C e X são bem pequenos, em todos os testes, sendo então mais um fator indicativo de que a ação de tal bacteriocina seja menos intensa quando comparada com a outra estirpe.

4 Discussão

As estirpes de *B. thuringiensis* são capazes de produzir toxinas eficazes no combate a outros microrganismos (SCHULZ; BONELLI; BATISTA, 2005). Isso é de extrema importância no controle da contaminação de alimentos, uma vez que, as toxinas de *Bacillus* além de apresentarem efeitos sobre outras estirpes de *B. thuringiensis*, não perdem sua atividade quando entram em contato com solvente, mas quando submetidas a altas temperaturas sua atividade é perdida. Tal fato foi possível ser mostrado neste estudo.

Glare; O'Callaghan (2000) salientam a importância de estudos a respeito do impacto deste entomopatógeno, visando principalmente mostrar sua capacidade de substituir ou interagir com inseticidas convencionais, minimizando os riscos ambientais e na saúde das pessoas.

As estirpes produtoras de bacteriocina indicam boa atividade quando colocadas na presença de isopropanol, não sendo degradadas por este solvente. Isopropanol é um solvente orgânico muito solúvel em água, da mesma maneira que etanol, metanol e acetona, por esse motivo, este reage com a parte hidrofílica do composto antimicrobiano, não inibindo a

atividade deste (CHERIF *et al.*, 2006). Há dois tipos descritos na literatura de bacterionas que apresentam atividade na presença de solvente orgânico. Thuricina, a primeira bacteriocina isolada de *B. thuringiensis* mantém sua atividade quando dissolvida em solventes orgânicos (FAVRET; YOUSTERN, 1989). Entomocina 110 quando incubada a 10% de solvente orgânico (acetona, butanol, metanol e tolueno), não afeta sua atividade (GRAY *et al.*, 2006a).

Quando aquecidas entre 80 a 85 °C perdem sua atividade de inibição. Tais características de termoestabilidade são vistas em outras bacteriocinas de *B. thuringiensis*. Thuricina perde de efeito inibitório quando aquecida a 96 °C (FAVRET; YOUSTEN, 1989). Morricina 269 e Kurstacina 287, consideradas termotolerantes mantêm sua atividade até 80° C (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007). Thuricina 439 não há perda de atividade até 80° C, mas quando incubada a 120° C por 15 minutos torna-se inativa, perdendo sua atividade completamente (CHEMINI *et al.*, 2007). A Thuricina S quando incubada a 121° C por 10 minutos, perde totalmente sua atividade (CHEMINI *et al.*, 2007). Bacthuricina F4 apresenta-se estável até 70 °C e quando incubado a 90 °C por 30 minutos pode conservar sua atividade em 20% (KAMOUN *et al.*, 2005). Thuricina 17 não apresenta alteração na atividade até 100 °C, mas quando incubado a 121° C por 5 minutos perde totalmente sua atividade (GRAY *et al.*, 2006a).

As demais bacteriocinas apresentam-se mais resistentes em relação às outras. A Thochicina suporta temperaturas de até 90 °C por 30 minutos (PAIK *et al.*, 1997). A Thuricina 7 também apresenta termoestabilidade quando submetida a temperaturas elevadas, mantendo 90% da sua atividade quando incubada a 90° C (CHERIF *et al.*, 2001). Entomocina 9 e Entomocina 110 mantém atividade de 72% e 53% respectivamente, quando incubadas a 121° C por 20 minutos (CHERIF *et al.*, 2003). Kenyacina 404, entomocina 420 e tolworthicina 524 são consideradas termoresistentes por manter atividade até temperaturas de 121 °C (BARBOZA-CORONA *et al.*, 2007).

É observado que cada tipo de bacteriocina apresenta uma característica diferente quando submetida a uma determinada temperatura e um tipo de solvente, mediante a esses fatores elas podem ser classificadas. De acordo com os resultados obtidos e a comparação com resultados mostrados em literatura sugere-se que o tipo de bacteriocina presente nesse estudo seja a thuricina, pois esta apresenta atividade quando dissolvida em solventes orgânicos e há perda de atividade quando aquecida a 96 °C, sendo a temperatura mais próxima da usado no estudo.

5 CONCLUSÃO

De dezesseis amostras de solo do cerrado seis apresentaram morfologia típica sugerindo serem *Bacillus thuringiensis* e somente duas estirpes apresentam produção para bacteriocinas, fato observado pelo ensaio de inibição entre estirpes.

O composto antimicrobiano inibe estirpes de *B. thuringiensis*.

O composto antimicrobiano é secretado pelo Bacillu no meio em que cresce, pois quando usado somente seu caldo filtrado apresenta inibição.

O composto antimicrobiano não é termotolerante, pois quando aquecido a 80 °C perde sua atividade de inibição.

A atividade do composto antimicrobiano não é afetada quando este é dissolvido em solvente orgânico (isopropanol).

Sugere-se que essas duas estirpes sejam produtoras de bacteriocina e que essa seja Thuricina, pois é a que mais se adequa nos resultados obtidos nessa pesquisa em comparação com a literatura de outros trabalhos realizados. Sendo de classe III devido a sua alta massa molecular.

Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains production of antimicrobial agents

Abstract

Bacillus are Gram-positive, spore-forming heat tolerant and desiccation. They have great adaptability as physiological conditions (temperature, pH and salinity). Most species can produce substances that can be inhibitory for both itself and for other microorganisms. It has been reported, since the 50s, that various bacteria of the genus *Bacillus* has the ability to produce substances with antimicrobial activity, such as peptides or bacteriocins. The objective of the research was to identify strains of *B. thuringiensis* present in cerrado soils to produce substances with inhibitory effect against other microorganisms. 16 samples were collected from soil and isolation procedures carried out with dilution principle 10 and 100 times using 1 g samples of soil, thermal shock application and inoculation in a Petri dish containing LB agar medium. The plates were placed in the greenhouse for 48 h at 28 ° C. Of all samples, six showed growth and, from these, inhibition assays were performed to test the ability to produce bacteriocins. The assay was performed by adapting the method of diffusion wells. After incubation at 28 ° C for 24 h the plates were observed for the formation of halos, indicating inhibition. In this case, only two strains showed this property, and then subjected to further testing inhibition (test broth; test thermal stability test with organic solvent) to assess their activity. Thus, strains of *B. thuringiensis* have the capacity to produce toxins inhibiting the growth of other strains of *B. thuringiensis* even when the broth used, because these toxins secreted in the extracellular environment, being inhibited when heated to 80 ° C and activated when dissolved in an organic solvent.

Key words: Bacteriocin. Peptide. Toxin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHERN, M.; VERSCHUEREN, S.; SINDEREN, D. V. Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiol. Lett., v. 220, p. 127-131, 2003.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control 17, 454–461.

Aronson AI, W Beckman and P Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol REV 50:1-24.

ARONSON. A. I.; SHAI, Y. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxian are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters, v.195, n.1, p.1-8.

BARBOZA-CORONA, J.E *et al.* Bacteriocin-like inhibitor substances produced by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. Arch. Microbiol. V.187, p. 117-126, 2007.

BIZANI, D. Purificação e caracterização de bacteriocina cereína 8^a, produzida por uma linhagem de *Bacillus cereus*. 2004. 124p. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias_ - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

Bowdish DM, Davidson DJ, Hancock RE (2005) A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. Curr Protein Pept Sci 6:35–51

CHEMINI, S. Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new antiListeria bacteriocin form *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. v 53, p.284-290, 2007.

CHEN, H. e HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science end food safety. v. 2 p. 82-100, 2003.

CHERIF, A. *et al.* Characterization and partial purification of entomocin 110, a newly identified bacteriocin from *Bacillus thuringiensis subsp.* Entomocidus HD110. Microbiological Research. v. 163, n. 6, p.684-692, 2008.

CHERIF, A. *et al.* Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis subsp. Entomocidus* HD9. J. Appl. Microbiol. v.95, p. 990-1000, 2003.

CHERIF, A. *et al.* Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. Lett. Appl. Microbiol. v 32, p. 243-247, 2001.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, December 2001.

COPPING, L. G.; MENN, J.J. 2000. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Management Science, v.57, n.11, p.3057-3061.

COTTER, P.D., HILL, C. e ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology v.3, p 777-788, Oct.2005.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. 410 D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. Food Rev. Int., v. 18, n. 2-3, p. 191-208, 2002.

Diop MB, Dibois-Dauphin R, Tine E, Jacqueline AN, Thonart P (2007) Bacteriocin producers from traditional food products. Biotechnol Agron Soc Environ 11:275–281

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; Mc MULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

Favret ME and AA Youston, 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J Invert Pathol 53: 206-216.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety. Chichester: John Wiley, 350 p.

GONZÁLES, J.M.J.; BROWN, B.S.; CARLTON, B.C. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. Proceedings of the National Academic of Science, v.79, n.10, p. 6951-6955.

GOULD, G. W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Prot., p. 82-86, 1996.

GRAY, E.J. *et al.* A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB 17: isolation and classification. J. Appl. Microbiol. V.100, p 545-554, 2006a.

Guilherme Corrêa Rasi. Estudo de atividade de peptídeos tipo de bacteriocina de *Bacillus thuringiensis*. UnB – Instituto de Biologia – Pós-graduação em Biologia Molecular abril.2010.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. Journal of Applied Microbiology, Bedford, v. 99, n. 6, p. 77-84, 2005.

JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev., v. 39, n. 2, p. 171-200, 1995.

JACK, R. W.; TAGG, J.R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev.. v.39, n 2, p. 297-309, 1944.

JAY, J. M. Modern food microbiology. 6th ed. London: Aspen Publ., 2000. 620 p.

JOERGER, M. C.,KLAENHAMMER, T. R. Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J.J. Bacteriol., v 172, p. 6339-47, 1990.

KAMOUN, F. *et al.* Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Microbiol. V.98, p.881-888, 2005.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. v. 12, n. 1-3, p. 39-85, 1993.

LERECLUS, D.; DELECLUSE, A.; LECADET, M. M. 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.; HIGGS, S.(Eds.). *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide: theory and practice. Chichester: John Wiley, p.37-70.

LUTHY, O.; WOLFERSBERGER, M. G. Pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* toxins. In: CHARLES, J.F.; DELÉCLUSE, A; NIELSEN-LE ROUX, C. (Ed.). Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. P. 167-180.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 29, de 22 de janeiro de 1996. Resolve aprovar a extensão de uso da nisina com a função de conservador para queijos pasteurizados no limite máximo de 12.5mg/kg. Diário Oficial, Brasília, 23 jan. 1996, Seção 1.

MIRALLES M. P.; PERES V.J. Aislamiento y establecimiento de uma coleccion de *Bacillus thuringiensis*. In: BRAVO, A.; CERON, J. (Eds). *Bacillus thuringiensis* em el control biológico. Bogotá, Colombia, p.201-232, 2004.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO, M. F.F. Detection and characterization of bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strains. Rev. Microbiol., v. 30, n. 2, p. 130-136, 1999.

NACLERIO, G. *et al.* Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 59:4313-4316.

NES, I.F. *et al.* Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. v. 70, n.2-4, p.113-128, 1996.

OPPEGARD, C. *et al.* Analysis of two peptides bacteriocins lactococcin G and enterocin 1071 by site-directed mutagenesis. Appl. Environ. Microbiol. v. 73, n 9, p.2931-2938, 2007.

PAIK, H.D.; BAE, S.S. e PAN, J.G. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* sunsp. *Tochigiensis*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol.v.19, p. 294-298, 1997.

PHELPS, R. J.; MCKILLIP, J. L. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol., v. 68, n. 6, p. 3147-3151, 2002.

RILEY, M.A. e WERTZ, J.E. Bacteriocin diversity: ecology and evolutionary perspectives. Biochimie. v.84, n.5-6, p. 357-364, 2002a.

RILEY, M.A. e WERTZ, J.E. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. Annu. Rev. Microbiol. v.56, p. 117-37, 2002b.

ROSA, C. M., FRANCO, B. MORENO. Bacteriocinas de bactérias lácticas. *Conscientiae Saúde*, Ver. Cient., UNINOVE- São Paulo. V.1: 09-15 2002

Savado A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traor SA (2006) Bacteriocins and lactic acid bacteria- a minireview. Afr J Biotechnol 5:678–683

Schillinger U, Becker B, Vignolo G, Holzapfel WH. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:159–168. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00612-2.

Schulz D. Bonelli R.R. Batista C.R.V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. Para conservação e processamento de alimentos. *Alim.Nutr., Araraquara.* v.16, n.4, p.403-411, out./dez. 2005.

TEYSSOU (R.), HANCE (P.) et BUISSON (Y.) : Les infections humaines à *Bacillus*. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 1998.

TORTORA, J. GERARD.; FUNKE, R. BERDELL.; CASE, L. CHRISTINE. *Microbiologia*. 8ª edição, p.172, 2006.

Von Staszewski M. & Jagus R. J. 2008. Natural Antimicrobials: Effect of Microgardtm and Nisin Against *Listeria innocua* in Liquid Cheese Whey. *International Dairy Journal*, 18: 255-259.